



MD 2336 F2 2003.12.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 2336 (13) F2
(51) Int. Cl.⁷: C 07 D 333/64;
A 61 K 31/4535;
A 61 P 5/32, 35/00

(12) BREVET DE INVENȚIE

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării	
<p>(21) Nr. depozit: a 2000 0162 (22) Data depozit: 2000.07.28 (31) Nr.: 60/146,286; 60/147,570; 60/149,773 (32) Data: 1999.07.29; 1999.08.06; 1999.08.19 (33) Țara: US (41) Data publicării cererii: 2001.04.30, BOPI nr. 4/2001</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2003.12.31, BOPI nr. 12/2003</p>
<p>(71) Solicitant: ELI LILLY AND COMPANY, US (72) Inventatori: BUSH Julie Kay, US; CONRAD Preston Charles, US; FLOM Merlyn Gerard, US; LUKE Wayne Douglas, US (73) Titular: ELI LILLY AND COMPANY, US (74) Re prezentant: GLAZUNOV Nicolai, MD</p>	

(54) Hidrat cristalin de hidrociorură de 6-hidroxi-3-(4-[2-(piperidin-1-il)etoxi]fenoxi)-2-(4-metoxifenil)benzo[b]tiofen, procedeu de obținere, compoziție farmaceutică care îl conține și utilizarea pentru inhibarea stărilor patologice și activarea colinacetyltransferazei

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la tehnologiile farmaceutice, în special la o formă cristalină nouă de hidrociorură de 6-hidroxi-3-(4-[2-(piperidin-1-il)etoxi]fenoxi)-2-(4-metoxifenil)benzo[b]tiofen, la un procedeu de obținere și la o compoziție care o conține.

Hidratul cristalin de hidrociorură de 6-hidroxi-3-(4-[2-(piperidin-1-il)etoxi]fenoxi)-2-(4-metoxifenil)benzo[b]tiofen (arzo fen), F-1, reprezintă un compus cu un grad înalt de cristalizare. Compoziția farmaceutică pe baza lui conține unul sau mai mulți purtători, diluanți sau excipienți și, opțional, estrogen, progesterină, un inhibitor al aromatazei, un analog al hormonului, care eliberează hormonul luteinizat (LHRH) și un inhibitor al acetylcolinesterazei. Procedeu de obținere a compusului menționat prevede cristalizarea hidrociorurii de 6-

2
5 hidroxi-3-(4-[2-(piperidin-1-il)etoxi]fenoxi)-2-(4-metoxifenil)benzo[b]tiofen din tetrahidrofuran.

10 Compusul declarat se poate utiliza pentru inhibarea stărilor patologice asociate cu deficiență de estrogen, cum ar fi fibroza uterină, endometrioza, proliferarea celulelor musculare netede aortale, restenoza, cancerul estrogen-dependent (inclusiv cancerul mamar și cancerul uterin), cancerul de prostată, hiperplazia benignă a prostatei, osteoporoză, afecțiuni cardiovasculare, hiperlipidemia, tulburări ale SNC și boala Alzheimer, prevenirea cancerului mamar și activarea colinacetyltransferazei.

15 Revendicări: 16
Figuri: 5

MD 2336 F1 2003.12.31

MD 2336 F2 2003.12.31

3

Descriere:

Prezenta invenție se referă la tehnologiile farmaceutice, în special la o formă cristalină nouă de hidrat de hidroclorură de 6-hidroxi-3-(4-[2-(piperidin-1-il)etoxi]fenoxi)-2-(4-metoxifenil)benzo[b]tiofen, la un procedeu de obținere a lui și la compozițiile care îl conțin.

Se cunoaște hidroclorura de 6-hidroxi-3-(4-[2-(piperidin-1-il)etoxi]fenoxi)-2-(4-metoxifenil)benzo[b]tiofen (arxoxifen) în forma cea mai generală [1], examinată detaliat ulterior [2, 3]. Arxoxifenul reprezintă un antagonist/agonist mixt nesteroid al estrogenului, utilizat, printre altele, pentru reducerea colesterolului în sânge, inhibarea hiperlipidemie, osteoporozei, formelor de cancer estrogen-dependent, inclusiv a cancerului mamar și uterin, endometriozei, tulburărilor SNC, incluzând boala Alzheimer, proliferării celulelor musculare netede aortale și restenozei.

Mai precis, arxoxifenul este util și în prezent se aplică în clinici în tratamentul cancerului mamar generalizat receptor-positiv, în tratamentul suplimentar al pacienților receptor-positivi după un tratament respectiv sistemic și local; pentru reducerea generalizării cancerului mamar invaziv și neinvaziv și carcinomului ductal *in situ* (DCIS). Arxoxifenul de asemenea se utilizează în asociere cu radioterapia, inhibitorii aromatazei, analogii LHRH (*hormonului care eliberează hormonul luteinizant*) și inhibitorii acetilcolinesterazei (AChE).

Investigațiile cu utilizarea metodelor difracției pulverulente cu raze roentgen (XRD), analizei termogravimetrice (TGA), metodei cu rezonanță nucleară magnetică cu protoni (^1H RNM) și metodei lui Karl Fischer (KF) a masei generale de arxoxifen, izolate printr-o metodă cunoscută [2], relevă că materialul menționat este un hidratat, care se cristalizează slab și conține în rețeaua sa cristalină diferite cantități de component organic volatil (acetat de etil).

De obicei, substanțele care se cristalizează slab sunt mai puțin dezirabile pentru prepararea medicamentelor, comparativ cu substanțele care au un grad înalt de cristalizare. În plus, în general, este indezirabilă prepararea formulărilor farmaceutice cu conținut înalt de solvent organic (de exemplu, acetat de etil) din cauza toxicității posibile a solventului pentru recipient și modificării eficienței remediei sub influența acestuia. Arxoxifenul, obținut printr-o metodă cunoscută [2], poate fi utilizat ca preparat farmaceutic.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție este obținerea unei forme noi cristaline de arxoxifen, care nu ar conține solvent organic în rețeaua cristalină și care ar putea fi reproducă și obținută eficient la scară comercială.

Prezenta invenție se referă la o formă nouă nestoichiometrică de hidrat cristalin de hidroclorură de 6-hidroxi-3-(4-[2-(piperidin-1-il)etoxi]fenoxi)-2-(4-metoxifenil)benzo[b]tiofen (F-I) cu următoarele vârfuri pe difractograma radiologică: $7,9\pm 0,2$; $10,7\pm 0,2$; $14,9\pm 0,2$; $15,9\pm 0,2$; $18,3\pm 0,2$ și $20,6\pm 0,2^\circ$ la 2θ , obținute dintr-o sursă de iradiere de cupru.

În plus, prezenta invenție se referă la o compoziție farmaceutică cu conținut de F-I; unul sau mai mulți purtători farmaceutici, diluanți sau excipienți și opțional estrogen, opțional progestină, opțional un inhibitor al aromatazei, opțional un analog al LHRH și opțional un inhibitor al acetilcolinesterazei (AChE).

Estrogenul din compoziția menționată reprezintă Premarin[®]. Compoziția, conform prezentei invenții, mai conține progestină, care se selectează din grupa ce include noretinodrel și noretindron.

Inhibitorul AChE din compoziția menționată se selectează din grupa constituită din salicilat de fizostigmină, hidroclorură de tacrin și hidroclorură de donepezil.

Într-un alt aspect, prezenta invenție conține adțional la unul sau mai mulți purtători, diluanți sau excipienți farmaceutici, estrogen și progestină.

Prezenta invenție se referă de asemenea la un procedeu de obținere a compusului menționat, care include cristalizarea hidroclorurii de 6-hidroxi-3-(4-[2-(piperidin-1-il)etoxi]fenoxi)-2-(4-metoxifenil)benzo[b]tiofen din tetrahidrofuran.

În plus, prezenta invenție asigură utilizarea lui F-I pentru inhibarea stărilor patologice, cum sunt fibroza uterină, endometrioza, proliferarea celulelor musculare netede aortale, restenoza, cancerul mamar, cancerul uterin, cancerul de prostată, hiperplazia benignă a prostatei, osteoporoza, afecțiunile cardio-vasculare, hiperlipidemia, tulburările SNC și boala Alzheimer, precum și utilizarea F-III în producerea medicamentelor pentru inhibarea unor astfel de afecțiuni.

Prezenta invenție se referă de asemenea la metode de utilizare a F-I pentru activarea colin-acetiltransferazei (ChAT).

Într-un alt aspect al prezentei invenții, acțiunea de inhibare este profilaxia.

Invenția se explică prin desenele din fig. 1-5, care reprezintă:

- fig. 1, imaginea tipică a colorimetriei diferențiale cu scanare (DSC)/TGA pentru S-II;

- fig. 2, imaginea tipică (DSC)/TGA pentru F-I;

- fig. 3, imaginea tipică (DSC)/TGA pentru F-III;

- fig. 4, izotermele sorbtiei umidității pentru F-I și F-III;

- fig. 5, desolvatarea lui S-II ca funcție temporală și a temperaturii de uscare.

Masa de arxoxifen, obținută prin metoda cunoscută [2] (exemplul 41, cristalizarea din amestec de etanol și acetat de etil, filtrarea și uscarea checului de filtrat în vid până la o greutate constantă la temperatura camerei), a

MD 2336 F2 2003.12.31

4

fost caracterizată prin metoda XRD, determinându-se că este o substanță care se cristalizează slab. Prin metoda ^1H RNM s-a confirmat că masa de material conține 6% de acetil acetat.

Procedeu de cristalizare cunoscut [2], a fost ulterior modificat, astfel că etanolul se adaugă într-o suspensie de arzoxifen brut în acetat de etil fierbând. După răcire și filtrare în vid, substanța solidă, obținută prin această metodă modificată, reprezintă un solvat cu un grad înalt de cristalizare de arzoxifen în amestec acetat de etil/apă (numit în continuare S-II), care ulterior s-a identificat ca fiind material de start pentru F-I.

F-I se poate obține prin eliminarea acetatului de etil din rețeaua cristalină prin uscarea/recoacerea în vid a S-II la temperaturi înalte. Timpul și temperatura, necesare pentru recoacerea lui S-II, pentru a obține F-I, variază de la lot la lot, însă de obicei constituie circa 5 zile la o temperatură de circa 100°C. Temperaturile înalte sunt necesare pentru conversia S-II în F-I, deoarece la suspensionarea lui S-II în apă la temperatura ambiantă sau depozitarea eșantionului la 98% UR pentru 3 săptămâni nu se produce conversia în F-I. În plus, uscarea lui S-II în cuptorul de convecție la temperaturi înalte nu desolvatează nici un material, ceea ce sugerează că vidul este necesar de asemenea pentru a scoate acetatul de etil din rețeaua lui S-II. Mai potrivită este obținerea rapidă a F-I prin cristalizarea arzoxifenului (sau a oricărei modificări polimorfe a lui/solvat) din tetrahidrofuran și izolarea lui la temperatura ambiantă. Această cristalizare, de preferință, se realizează cu dizolvarea inițială a arzoxifenului în tetrahidrofuran umed (1-10% apă după volum, mai potrivit fiind 2,5-7,5% și cel mai potrivit – de la 4,5 la 5,5%) cu eliminarea ulterioară a apei menționate prin distilare la presiunea atmosferică. Exemplul de astfel de cristalizare este descris detaliat în continuare în exemplul 2. În cazul în care F-I se obține prin acest procedeu de cristalizare ameliorat, nivelul relativ total de substanțe (TRS) <0,5%.

Materialul inițial de arzoxifen, potrivit pentru cristalizarea sus-menționată, include, nefiind exhaustiv, S-II, F-I, arzoxifenul obținut prin procedeu cunoscut [2] și oricare amestec al acestuia. Nu este important ce formă inițială de arzoxifen se utilizează, deoarece cristalizarea din AIP și apă, conform procedurii descris în document, rezultă cu cristale de F-I. Pentru sinteza lui F-I la scară comercială poate fi avantajoasă adăugarea unui agent de cristalizare.

F-III, un alt hidrat neostoichiometric al arzoxifenului, se obține ușor și se separă prin cristalizarea arzoxifenului (sau oricărei modificări polimorfe a acestuia/solvat) din amestec de alcool izopropilic (AIP) și apă la temperatura ambiantă. Rapoartele dintre apă și AIP (volum : volum) de obicei constituie între 1:1 și 9:1. Mai potrivit este raportul de 2,5 și 5,6:1, cel mai potrivit fiind de 3 și 5,6:1. Raportul AIP nu este esențial pentru realizarea cristalizării lui F-III, însă influențează asupra randamentului. Pentru sinteza F-III la scară comercială poate fi avantajoasă folosirea unui agent de cristalizare a F-III. Materialul inițial potrivit de arzoxifen pentru cristalizarea menționată include S-II, F-I, arzoxifen, obținuți prin procedee cunoscute [2], sau oricare amestecuri ale acestora, însă acestea nefiind exhaustive.

Caracteristica și diferențierea S-II; F-I și F-III

Pentru caracteristica S-II, F-I și F-III se folosesc procedeele DSC/TGA și XRD. TGA deseori se utilizează pentru detectarea diferențelor între diferite forme de substanță solidă, deoarece temperatura (temperaturile) la care se produc modificările fizice în substanță, de obicei, reprezintă caracteristica polimorfului sau soluției. DSC este un procedeu care se utilizează frecvent în screeningul compușilor pentru formarea modificării polimorfe și solvatului. XRD este o tehnică care detectează ordinea îndepărtată în substanța cristalină.

Arzoxifenul, obținut prin procedeu cunoscut [2], are o radiogramă cu un raport mic al semnalului către fon și linia de bază ascendentă, ceea ce indică o substanță ce se cristalizează slab. De aceea se compară F-I și F-II cu substanța (S-II), obținută prin procedeu modificat, examinat anterior, de cristalizare a arzoxifenului (adăugarea etanolului în suspensie de arzoxifen în acetat de etil fierbând).

Imaginile reprezentative ale DSC/TGA pentru S-II, F-I și F-III sunt prezentate în fig. 1, 2 și 3, respectiv. Imaginea DSC pentru S-II atestă o reacție endotermă intensă, inițiată la circa 62°C, care corespunde pierderii acetatului de etil și apei din rețea. Endoterma, inițiată la circa 152°C, reprezintă o topitură. Pierderea în TGA a masei de circa 2,5% se produce concomitent cu prima transformare, în timp ce 0,5% de pierdere a masei restante se produce nemijlocit până la începutul topirii, ceea ce sugerează că o oarecare cantitate de molecule de solvent se mențin în rețea mai rigid.

Imaginea DSC pentru F-I atestă o reacție endotermă intensă, inițiată la circa 75°C, urmată de a doua reacție endotermă, inițiată la 155°C, corespunzătoare topiturii. Imaginea în TGA pentru F-I indică o pierdere permanentă de 0,3% din masă cu o pierdere semnificativă ulterioară de 1,5%, ceea ce împreună reprezintă dehidratarea rețelei. Debutul primei DSC transformări și pierderea în TGA a masei respective deviază nesemnificativ în urma diferențelor de viteze de încălzire. Pierderea inițială a masei reprezintă o hidratare cu reținerea redusă a apei, în timp ce pierderea secundă a masei corespunde la circa 0,5 mol de apă, prezente în rețea la o umiditate relativă foarte joasă (sub 5% - vezi datele sorbtiei umidității).

Imaginea DSC pentru F-III reprezintă o curbă a reacției endoterme intense la o temperatură joasă - circa 30°C, cu o reacție endotermă secundă completă relativ slabă, inițiată la 70°C, și transformarea finală, inițiată la circa 146°C, corespunzătoare topiturii. Pierderea semnificativă a masei de 1,5% (circa 0,5 mol) în TGA, care coincide cu prima reacție endotermă, corespunde pierderii moleculelor de apă slab reținute, în timp ce pierderea suplimentară de circa 1,6% de masă la o temperatură ce depășește 60°C reprezintă o pierdere a moleculelor reținute mai rigid, adică a moleculelor prezente la o umiditate relativă foarte joasă. Pierderea masei, observată la temperaturi ce depășesc 170°C, corespunde descompunerii lui F-III.

MD 2336 F2 2003.12.31

5

Schemele XRD pentru F-I și F-III reprezintă vârfurile ascuțite și linia de bază plată, care indică substanțele cu grad de cristalizare înalt. Pozițiile unghiulare ale vârfurilor la 2θ și datele I/I_0 respective pentru eșantioanele de F-I, F-III și S-II sunt prezentate în tabelul 1. Cu toate că numeroase reflectări ale intensității, de obicei, se află în asemenea unghiuri ale difracției, fiecare din forme prezintă o radiogramă pulverulentă deosebită, indicând deosebiri distincte între S-II, F-I și F-III.

În domeniul cristalografiei este bine cunoscut că pentru orice modificare polimorfă intensitățile relative ale vârfurilor de difracție se pot modifica în funcție de orientarea potrivită, determinată de un așa factor, cum este morfologia cristalelor. În cazul în care există o influență a orientării potrivite, intensitatea vârfurilor se modifică, însă pozițiile caracteristice ale vârfurilor modificării polimorfe nu se modifică (The United States Pharmacopeia # 23, National Formulary # 18, pages 1843-1844, 1995). Astfel, în baza intensității vârfurilor, precum și a poziției lor, în cazul în care imaginile se obțin dintr-o sursă de iradiere de cupru, F-I poate fi identificat după prezența vârfurilor la $7,9\pm 0,2$; $10,7\pm 0,2$; $14,9\pm 0,2$; $15,9\pm 0,2$; $18,3\pm 0,2$ și $20,6\pm 0,2^\circ$ la 2θ .

Tabelul 1

S-II		F-I		F-III	
2θ ($^\circ$)	I/I_0 (%)	2θ ($^\circ$)	I/I_0 (%)	2θ ($^\circ$)	I/I_0 (%)
4,67	1,3	4,92	2,6	4,63	20,8
5,03	6	7,69	34,6	7,82	100
6,83	5,8	7,91	100	9,29	16,9
7,17	16,1	9,89	2,5	10,16	22,7
7,73	100	10,22	2	10,35	5,4
9,03	1,3	10,74	7,4	13,77	10,7
9,31	1,7	14,86	9,1	13,97	15,2
9,66	2,4	15,45	2,3	15,06	6,9
10,27	1,6	15,92	15,9	15,71	22,3
10,47	2,2	16,67	1,7	15,87	7,4
10,91	6,3	16,98	3,1	16,35	34,5
13,63	2,1	18,28	17,8	16,77	12,3
14,09	4,6	18,56	7	17,28	10
15,10	4,1	20,58	13,1	17,62	47,9
15,52	10,5	20,85	8,8	18,09	43,9
16,45	9,1	21,64	3,9	20,43	42
16,67	7,6	22,19	4,8	20,80	33,6
17,21	4,9	22,65	2,9	21,31	42,7
17,53	2,4	23,28	3,4	21,71	13
18,33	28,2	23,97	11,8	21,85	14,5
18,69	11,1	24,31	6,3	22,13	12,8
19,37	3,5	25,52	3,9	22,26	16,3
20,29	8,6	26,20	3,4	23,51	13,2
20,64	17,2	26,47	3,1	23,69	15,9
21,02	12,7	28,84	6,4	23,91	25,6
21,68	5,1	30,13	3,5	24,31	38,7
22,01	8,3	31,12	2,9	25,22	8
22,29	8			25,67	8,9
23,17	7,8			27,05	18,9
23,39	9,1			27,89	13,3
24,30	13,6			28,24	8,6
25,76	3,4			28,71	21,3
28,10	1,8			29,89	8,9
28,73	10,9			30,24	18,7
29,42	3,2			30,88	5,8
30,00	3,7			31,44	7,6
30,89	2,1			33,06	4,5
31,34	2,4			34,36	6
31,70	1,1				
32,81	1				
32,91	0,8				

MD 2336 F2 2003.12.31

6

33,48	2				
26,05	4				
26,63	5,5				
27,01	3,1				
27,49	2,8				

Caracteristica ulterioară a F-I și F-III

S-a studiat higroscopicitatea lui F-I și F-III. În fig. 4 sunt prezentate izotermele sorbției umidității pentru F-I și F-III. După expoziția inițială a eșantioanelor la o umiditate relativă de până la 5% UR se produce o creștere imediată a masei umede cu 1,5 și 1,7% pentru F-I și F-III, respectiv, echivalentă cu circa 0,5 mol de apă. Ambele forme manifestă o sorbție continuă a umidității în întreaga zonă a umidității, ceea ce este rezultatul încorporării moleculelor de apă în rețea.

Diferențele înregistrate în absorbția umidității de către aceste două forme, probabil, reflectă cantitatea de apă, care poate fi încorporată în două rețele (adică valoarea spațiului accesibil al rețelei, care poate încorpora moleculele de apă). Absența histerezisului în izotermele sorbție-desorbție pentru F-I și F-III indică că formele cristaline se echilibrează rapid la orice umiditate.

Profilurile sorbției umidității pentru F-I și F-III atestă că aceste forme, în esență, reprezintă hidrați nestoichiometrici. La umiditatea relativă a mediului ambiant (de circa 50% UR) F-I conține circa 1,7% de apă sau 0,5% mol de apă, respectiv, în timp ce F-III absoarbe circa 3,0% de apă, ceea ce corespunde la circa 0,85 mol de apă. Masa principală de forme F-I și F-III se echilibrează rapid cu atmosfera, astfel că conținutul de apă, determinat prin metode analitice, este o reflectare a umidității relative în timpul colectării datelor. Conform datelor DSC, deosebirile detectate de la un lot la altul, probabil, sunt manifestate de eșantioanele hidratate în grade diferite, din cauza păstrării lor în diferite condiții ale mediului ambiant.

Au fost obținute radiogramele eșantioanelor de F-I și F-III, care s-au păstrat la umiditate relativă diferită (0, 22, 50 și 80%). În cazul în care crește umiditatea relativă, se produce o deviere treptată a vârfurilor inițiale (0% UR) pentru F-III la circa 13,8; 17,6; 18,0; 20,5 și 24,0° la 2θ, precum și o deviere nesemnificativă a vârfurilor mai puțin intense. Aceste modificări înregistrate în radiogramele pentru F-III atestă că, în cazul în care crește umiditatea relativă, se modifică dimensiunile celulei elementare, probabil, pentru a încorpora moleculele de apă care se rețin slab. Devierea permanentă a vârfurilor în funcție de umiditate corelează cu datele sorbției umidității, fapt despre care atestă majorarea lentă a masei în limitele acestei zone a UR, demonstrând variabilitatea formării hidratului.

Un experiment similar s-a realizat cu F-I, pentru a stabili influența modificării umidității relative (0; 25; 52; 73 și 95% UR) asupra rețelei lui. În cazul în care crește umiditatea relativă se înregistrează doar o deviere nesemnificativă a vârfurilor UR de 0% cu circa 7,7; 18,3; 18,5; 20,5; 20,8° la 2θ. De asemenea s-a constatat că la o umiditate relativă mai înaltă, în special la UR de 73 și 95%, vârfurile la circa 7,7; 20,8 și 24,1 devin ceva mai late și mai puțin diferențiate, indicând că apa se dovedește a fi absorbită în componentele amorfe (sau plastică substanța solidă). Devierile vârfurilor pe radiogramele pentru F-I sunt mai puțin dramatice, comparativ cu devierea vârfurilor în cazul expunerii F-III la umidități relative diferite. Aceasta sugerează că rețeaua F-I nu se supune expansiunii și/sau contracției, ca rețeaua F-III.

S-a constatat că în pofida abilității F-III de a absorbi de două ori mai multă apă, F-I și F-III sunt stabile în limitele întregii zone de umiditate relativă. S-a stabilit că ambele forme au dimensiuni ale cristalelor, morfologie, solubilitate în apă și viteze de dizolvare comparabile.

Pentru a urmări desolvatarea pentru S-II, ca funcție temporală și a temperaturii de uscarea, s-a realizat un studiu cu uscarea (fig. 5). În cadrul experimentului cu desolvatare s-au obținut radiogramele pentru diferite puncte temporale. Majoritatea vârfurilor difracției, obținute în studiul desolvatării S-II, s-au dovedit a fi cu unghiuri similare celor pentru F-I, confirmând, că rețelele S-II și F-I sunt foarte asemănătoare. Dispariția vârfurilor difracției la circa 6,8; 7,2 și 14,0° la 2θ numai după o uscarea minimă sugerează că aceste reflectări se pot referi la secțiunile cristalografice care conțin densitatea parțială a electronilor moleculelor de acetat de etil.

Răscoacerea îndelungată în vid a substanței solvate la temperaturi înalte rezultă cu F-I. F-I, obținut în așa mod, manifestă pe radiograme un grad înalt de cristalizare. De aceea substanța, obținută prin cristalizare din soluție de etanol și acetat de etil cu uscarea ulterioară în vid timp de câteva ore, conform unui procedeu cunoscut [2], manifestă o cristalizare foarte redusă, deoarece într-un astfel de procedeu se obține S-II parțial desolvatat.

F-I și F-III au unele avantaje, comparativ cu forma de arzoxifen examinată anterior din stadiul anterior. Comparativ cu arzoxifenul, obținut prin procedeele cunoscute [2], F-I și F-III sunt mai stabile la temperatura mediului ambiant și de aceea sunt mai ușor manevrate în cadrul tratării farmaceutice, adică la crearea unor compoziții dozate. În plus, F-I și F-III sunt mult mai cristaline, comparativ cu forma cunoscută [2]. Substanțele cristaline, de obicei, sunt mai puțin higroscopice și mai stabile (adică sunt abile pentru o descompunere chimică, își mențin consistența), comparativ cu substanțele amorfe și de aceea sunt mai dezirabile pentru formularea compozițiilor. În plus, spre deosebire de forma arzoxifenului, obținut prin procedeele cunoscute [2], care conține în rețeaua sa acetat de etil și apă, F-I și F-III conțin numai apă.

55

MD 2336 F2 2003.12.31

7

Metode de investigație

Măsurările DSC s-au efectuat cu dispozitivele 2920 TA, modulate de DSC, atașate la analizatorul termic 3100 și asigurate cu un sistem de răcire. Eșantioanele (3...5 mg) se încălzeau în rezervoare de aluminiu contorte de la 10 la 240°C, viteza de încălzire fiind de 2°C/min.

5 Analizele TGA s-au realizat cu dispozitivul TA 2050, cu un analizator termogravimetric, atașat la analizatorul termic 3100. Eșantioanele (5-10 mg) se încălzeau în rezervoare deschise de la 25 la 250°C, viteza de încălzire fiind de 5°C/min.

10 Radiogramele s-au obținut cu difractometrul pulverulent radiologic Siemens D5000, asigurat cu sursa CuK α ($\lambda=1,54056 \text{ \AA}$) și detectorul Kervex al stării solide, care funcționează la 50 kV și 40 mA. Fiecare eșantion se scana între 4 și 35° în 2 θ . Eșantioanele se lasau pentru echilibrare cel puțin pentru 30 minute la temperatura și/sau umiditatea relativă necesară până la colectarea datelor.

15 Pentru F-I și F-III măsurările higroscopicității s-au realizat prin metoda VTI în modul următor. Fiecare eșantion s-a uscat în vid la 60°C până nu s-a mai înregistrat pierderea ulterioară a masei, timp în care în camera de experiențe s-a instalat umiditatea relativă de 0%. Izotermele sorbției umidității s-au înregistrat la 25°C utilizând balanța cu pârghie cu vid VTI cu scară gradată în procente de umiditate, în următoarele condiții: mărimea eșantionului 10-15 mg; diapazonul adsorbției/desorbției 0-95% umiditatea relativă; pasul intervalului 5%; intervalul de timp între colectarea eșantioanelor 10 minute.

20 Exemplele ce urmează ilustrează procedeele de obținere a hidratului, conform prezentei invenții. Ele nu restrâng volumul protecției acestor procedee și nu trebuie astfel interpretate.

Moduri de preparare

Modul de preparare 1

S-II

25 Arzoxifenul brut (1,58 g de substanță, obținută prin procedeul, descris în exemplul 41 din Brevetul US nr. 5723474, referințele la care sunt încorporate în descriere) se suspensionează în 28 ml de acetat de etil și se încălzește într-un balon în reflux. Pentru realizarea dizolvării se adaugă etanol (18 ml). Soluția se fierbe timp de 20 minute, apoi se lasă să se răcească la temperatura camerei. Precipitatul se izolează prin filtrare în vid și se spală cu 30 ml de acetat de etil, pentru a obține 1,05 g de substanță solidă albă pulverulentă.

Exemple

30 **Exemplul 1**

F-I din S-II

S-II se usucă într-o etuvă cu vid (~100 mm Hg) la 100°C timp de 118 ore pentru a obține F-I.

Exemplul 2

Procedeu ameliorat de obținere a F-I din arzoxifen

35 Un balon cu fundul rotund cu trei găuri cu capacitatea de 1 l, asamblat cu un deflegmator și agitator superior, se încarcă cu 25,0 g de arzoxifen, 475 ml de tetrahidrofuran și 25 ml de apă. Vasul de reacție se echipează, apoi, pentru distilare simplă. Amestecul de reacție se încălzește în reflux și se elimină 250 ml de distilat. Încălzirea se înlătură rapid și în vas se adaugă 250 ml de tetrahidrofuran anhidru proaspăt. Distilarea la presiunea atmosferică se continuă cu eliminarea adițională a 250 ml de distilat. Încălzirea se înlătură rapid, se adaugă 250 ml de tetrahidrofuran proaspăt și se elimină adițional 250 ml de distilat. Se adaugă suplimentar 250 ml de tetrahidrofuran și amestecul se încălzește în reflux. La această adădire a tetrahidrofuranului se formează un precipitat alb. Amestecul de reacție cu agitare se lasă să se răcească lent timp de 3 ore, timp în care substanțele solide adiționale se precipită și șlamul atinge temperatura ambiantă. Șlamul cristalin se filtrează și se usucă în vid la 50°C pentru patruzeci și opt de ore cu o insuflare nesemnificativă de N₂. Randamentul este de 22,5 g (90,0%). Analiza XRD atestă că spectrele checului umed și substanței solide uscate, în esență, sunt identice cu spectrul pentru F-I, obținut anterior. În analiza DSC s-a determinat punctul de topire 157°C, în timp ce TGA relevă 1,5% pierderi de masă în intervalul dintre temperatura ambiantă și 100°C. Puritatea în CLRÎ, calculată ca bază liberă, a constituit 88,1% contra eficienței teoretice de 92,9%. HLRÎ indică nivelul total de substanță de 0,44%.

Exemplul 3

50 **F-I din [6-benziloxi-3-[4-[2-(piperidin-1-il)etoxi]fenoxi]-2-(4-metoxifenil)]benzo[b]tiofen-(S-oxid)**

100 Tetrahidrofuranul (261 ml), apa (45 ml), acidul sulfuric concentrat (6,14 g) și [6-benziloxi-3-[4-[2-(piperidin-1-il)etoxi]fenoxi]-2-(4-metoxifenil)]benzo[b]tiofen-(S-oxid) (eficiența CLRÎ 99%, nivelul total de substanțe în CLRÎ 0,35%) se combină și se agită până la omogenitate. Se adaugă 10% Pd/C (5,6 g se suspensionează în 22 ml de apă) cu 5 ml de apă pentru spălături. Suspensia obținută se evacuează și se lasă sub hidrogen la 60 psi. Temperatura reacției se aduce la 30°C. Peste 2 ore se adaugă 10% Pd/C (5,6 g) cu apă (30 ml). Hidrogenizarea la 60 psi și la 30°C se continuă 22 ore adițional. Se mai adaugă 4,40 g de 10% Pd/C în 30 ml de apă, iar hidrogenizarea se continuă la 60 psi și la 30°C timp de 2,5 ore adițional. Catalizatorul se elimină prin filtrare și pH filtratului se ajustează la 7,24 cu 50% hidroxid de sodiu. Se adaugă clorura de sodiu (8,66 g) dizolvată în apă (18 ml) și soluția bifazică se agită 30 minute, fazele se separă și faza apoasă se extrage din nou cu 50 ml de tetrahidrofuran. Fazele organice se combină și se concentrează până la volumul de 50 ml prin distilare la presiune atmosferică. La concentrat la 24°C se adaugă 180 ml de metanol timp de 1 oră. Șlamul cristalin obținut se agită pentru 30 minute la

MD 2336 F2 2003.12.31

8

24°C, se răcește până la 0°C și se agită 1 oră. Substanțele solide se separă prin filtrare și se spală succesiv cu 39 ml de apă și 39 ml de metanol cu uscarea ulterioară în vid peste noapte la 50°C. Rândamentul: 15,52 g (67,8%).

O porție de produs (10 g) din substanța obținută anterior se recrystalizează din tetrahidrofuran și apă prin modalitatea descrisă în exemplul 2.

5

Terminologia utilizată

Termenul utilizat "cantitate eficientă" definește o cantitate de F-I, care este capabilă să inhibe afecțiunea sau efectele ei nocive, descrise în prezenta invenție. În cazul în care F-I se administrează asociat cu estrogen, progesterină, inhibitorii aromatazei, analog al LHRH sau inhibitorul AChE, termenul "cantitate eficientă" de asemenea definește o cantitate de acest agent capabilă să realizeze efectul dezirabil.

10

Termenii "inhibitor" sau "inhibă" definesc semnificațiile lor uzuale, adică care previne, împiedică, restrânge, jugulează, ameliorează, diminuează intensitatea de manifestare a simptomelor, stopează sau face reversibilă progresarea sau severitatea stării patologice sau a complicațiilor ei, descrise în prezenta invenție.

15

Termenii utilizați "care previne", "prevenție", "profilaxie", "profilactic" și "a preveni" sunt interschimbabili și presupun reducerea probabilității, că la recipientul lui F-I vor persista incurabile sau se vor manifesta oricare stări patologice sau complicațiile lor, descrise în prezenta invenție.

20

Termenii "estrogen-deficitar" și "deficiență de estrogen" se referă la starea fie naturală, fie indusă clinic, în cazul în care femeia nu poate produce o cantitate suficientă de hormoni estrogeni endogeni pentru menținerea funcțiilor estrogen-dependente, de exemplu, menses, homeostazia masei osoase, funcției neuronale, stării sistemului cardio-vascular etc. Astfel de stări estrogen-deficitare se instalează în menopauză și în urma ovariectomiei chirurgicale și chimice, incluzând echivalentul ei funcțional, de exemplu, în rezultatul tratamentului medicamentos cu inhibitorii aromatazei, agonistii sau antagonistii GnRH, ICI 182780 etc. Afecțiunile, asociate cu depleția estrogenului, includ, nefiind exhaustive, osteoporoza, afecțiunea cardiovasculară și hiperlipidemia.

25

Termenul utilizat "estrogen" include compușii steroizi, caracterizați prin activitate estrogenică, cum ar fi 17 β -estradiol, estron, estrogen conjugat (Premarin[®]), estrogen de cal, 17 β -etinil estradiol etc. Compuși potriviți în bază de estrogen sunt Premarin[®] și noretindrol.

Termenul utilizat "progesterină" include compușii cu activitate similară progesterinei, cum ar fi progesteron, noretindrol, nongestrel, megestrol acetat, noretindron, etc. Agentul potrivit în bază de progesteron este noretindron.

30

Termenul utilizat "inhibitorii aromatazei" include compușii care sunt abili să inhibe aromataza, de exemplu, așa inhibitorii comercial accesibili, cum ar fi aminoglutemida (CYTANDREN[®]), anastrozol (ARIMIDEX[®]), letrozol (FEMARA[®]), formestan (LENATRON[®]), exemestan (AROMASIN[®]), etc.

Termenul utilizat în descrierea prezentei invenții "analogii ai LHRH" se referă la analogii hormonului care eliberează hormonul luteinizant, care inhibă producerea estrogenelor la femeile aflate în premenopauză și includ, de exemplu, goserlin (ZOLADEX[®]), leuprolid (LUPRON[®]) etc.

35

Termenul utilizat "inhibitorii AChE" include compușii care inhibă acetilcolinesteraza, de exemplu, salicilat de fizostigmină, hidroclorură de tacrin, hidroclorură de donepezil, etc.

40

Termenul "activează ChAT" definește amplificarea activității enzimeice a ChAT, adică accelerarea conversiei colinei până la acetilcolină. Această activare trebuie să includă amplificarea eficienței și/sau vitezei reacției ChAT și colinei și/sau creșterea cantității de ChAT, prezente în zona de acțiune. Această majorare a cantității de enzimă prezentă poate fi determinată de reglarea genică sau de un alt stadiu al sintezei în formarea enzimei și/sau reducerea inactivării și metabolismului enzimei.

Metodele selectate de testare

45

Metoda generală de pregătire a șobolanilor: Femelele de șobolani Sprague Dawley (masa corporală între 200 și 255 g) în vârstă de șaptezeci și cinci de zile (în cazul în care nu sunt alte specificații) au fost furnizate de laboratorul Charles River (Portage, MI). Animalele au fost supuse ovariectomiei bilaterale (OVX) ori s-au efectuat intervenții chirurgicale după Sham în laboratorul Charles River, fiind transportate peste o săptămână. La sosire ele erau amplasate în cuști metalice transportabile în grupuri a câte 3 sau 4 animale într-o cușcă, având acces *ad libitum* la mâncare (conținutul de calciu de circa 0,5%) și la apă timp de o săptămână. Temperatura încăperii s-a menținut la nivelul de 22,2 \pm 1,7°C, umiditatea relativă minimă 40%. Regimul de lumină în încăperea constituia 12 ore – lumină și 12 ore - întuneric.

50

Regimul de dozare și colectarea țesutului: După o săptămână de acclimatizare (adică două săptămâni după OVX) s-a inițiat administrarea F-I. 17 β -etinil estradiol sau F-I se administra *per os* (în cazul în care nu sunt alte specificații), în formă de suspensie în 1% carboximetilceluloză sau dizolvate în 20% ciclodextrină. Animalele primeau dozele de preparat zilnic timp de 4 zile. După seria de administrare a medicamentului, animalele erau cântărite și se aplica anestezia cu amestec de ketamină:xilazin (2:1, volum/volum) și eșantioanele de sânge se colectau prin punctura cardiacă. Apoi animalele se sacrificau prin asfixie cu CO₂, uterul se extirpa prin incizia mediană, se determina masa umedă a lui. 17 β -etinil estradiolul a fost furnizat de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.

60

Afecțiunea cardiovasculară/hiperlipidemia

Eșantioanele de sânge, colectate de la animalele menționate anterior, se lăsau pentru coagulare la temperatura camerei pentru 2 ore și se obținea serul prin centrifugare cu 3000 rotații pe minut timp de 10 minute. Colesterolul serului s-a determinat prin testul cu eficiență înaltă Boehringer Mannheim Diagnostics. Succint, colesterolul s-a oxidat până la colest-4-en-3-onă și peroxid de hidrogen. Apoi, peroxidul de hidrogen s-a interacționat cu fenol și 4-aminofenazon în prezența peroxidazei cu formare de colorant p-chinonă, care s-a determinat spectrofotometric la 500 nm. Concentrația de colesterol s-a calculat conform curbei standard. Toate investigațiile au fost automatizate, s-au realizat cu Biomek Automated Workstation.

Studiul peroxidazei eozinofilelor uterine

Uterele de la animalele menționate anterior s-au depozitat la 4°C până în momentul studierii enzimei. Uterele s-au omogenizat în 50 mM de tris-tampon (pH 8,0) cu conținut de 0,005% triton X-100. După adăugarea în tris-tampon a 0,01% peroxid de hidrogen și 10 mM de O-fenilendiamină (concentrațiile finale), timp de 1 minut s-a urmărit creșterea absorbției la 450 nm. Prezența eozinofilelor în uter este un indicator al activității estrogenice a compusului. S-a determinat viteza maximă în intervale de 15 secunde în limitele segmentului inițial liniar al curbei reacției.

Metoda de testare a inhibării osteoporozei

După realizarea pregătirii generale, descrise mai sus, șobolanii erau tratați zilnic timp de treizeci și cinci de zile (6 șobolani în grupul de tratare), în ziua a 36 fiind sacrificați prin asfixie cu bioxid de carbon. Perioada de treizeci și cinci de zile era suficientă pentru obținerea unui grad maxim de osteoporoză, care se determină conform prezentei invenții. În timpul sacrificării s-a extirpat uterul, s-au disecat țesuturile din exterior și conținutul lichid se elimina înainte de a determina masa umedă, pentru confirmarea deficienței de estrogenice, asociate cu ovariectomia completă. De obicei, ca răspuns la ovariectomie masa uterului se reducea cu circa 75%. Apoi, pentru examenul histologic ulterior, uterul s-a plasat în 10% formalină tampon neutru.

S-a efectuat excizia oaselor femurale drepte și s-a obținut radiograma numerică a metafizei periferice, care s-a analizat cu un program de analiză a imaginii (NIH). Părțile proximale ale oaselor tibiei ale acestor animale de asemenea au fost scanate prin tomografia computerizată cantitativă. Conform metodelor examinate mai sus, animalele administrău *per os* F-I sau etinilestradiol (EE₂) în hidroxipropil β -ciclodextrină 20%. F-I s-a utilizat de asemenea în asociere cu estrogen sau progestină.

Studierea proliferării MCF-7

Celulele MCF-7 de adenocarcinom mamar (ATCCHTB 22) s-au întreținut în mediul MEM (mediu esențial minim, fără roșu de fenol, Sigma, St. Louis, MO) suplimentat cu 10% ser bovin fetal (FBS) (volum/volum), L-glutamină (2 mM), piruvat de sodiu (1 mM), HEPES {N-[2-hidroxietil]piperazin-N'-[2-acid etansulfonic]} 10 mM, aminoacizi neesențiali și insulină de bovină (1 μ g/ml) (mediu de întreținere). Cu zece zile până la testare, celulele MCF-7 s-au transferat în mediul de întreținere, suplimentat cu 10% cărbune de lemn acoperit cu dextrină, care cuprindea ser fetal de bovină ((DCC-FBS) mediul de testare) care a substituit 10% FBS, pentru a epuiza acumulările interne de steroizi. Celulele MCF-7 s-au izolat din cutiile cu mediu de întreținere, utilizând mediul celular de disociere (Ca⁺⁺/Mg⁺⁺ fără HBSS (fără roșu de fenol) suplimentat cu 10 mM HEPES și 2 mM EDTA). Celulele s-au spălat repetat cu mediu analitic și numărul lor s-a ajustat până la 80000 celule/ml. Circa 100 ml (8000 celule) s-au introdus în alveolele cu fundul plat pentru microcultură (Costar 3596) și s-au incubat la 37°C în 5% CO₂ într-un incubator umidificat pentru 48 ore, pentru a asigura aderența și echilibrul celulelor după transfer. Seriile de diluții ale medicamentelor și DMSO, în calitate de control, s-au preparat în mediu analitic și 50 ml s-au transferat în microculturile triplicate, cu adăugarea ulterioară a 50 ml de mediu de testare până la un volum final de 200 ml. După 48 ore adiționale la 37°C în 5% CO₂ – incubator, microculturile s-au marcat cu impulsuri de timidină tratată cu tritiu (1 μ Ki/alveolă) timp de 4 ore. Cultivarea s-a finalizat cu congelare la -70°C pentru 24 ore cu dezghețare ulterioară și colectarea microculturilor, utilizând colectatorul de celule semiautomat Skatron. Cuantificarea eșantioanelor s-a efectuat cu scintilatorul cu lichid, utilizând contorul β Wallac BetaPlace.

Inhibarea tumorii mamare DMBA-induse

Tumorile mamare estrogen-dependente s-au produs la femelele de șobolani Sprague-Dawley, comercializate de Harlan Industries, Indianapolis, Indiana. Șobolanilor în vârstă de circa 55 zile li s-au administrat în asociere cu o singură hrănire orală 20 mg de 7,12-dimetilbenzo[α]antracenă (DMBA). Aproximativ peste 6 săptămâni după administrarea DMBA s-a inițiat palparea glandelor mamare la intervale de o săptămână în scopul depistării tumorilor. Din moment ce apărea una sau mai multe tumori, metric cu un șubler s-a măsurat diametrul maxim și minim al fiecărei tumori, măsurările s-au înregistrat și așa animale erau selectate pentru experimente. S-a încercat de a repartiza uniform tumorile de diferite dimensiuni între grupurile tratate și cele de control astfel, ca tumorile de dimensiuni medii să fie repartizate între grupurile de studiu. Grupurile de control și experimentale pentru fiecare experiment conțineau de la 5 la 9 animale.

MD 2336 F2 2003.12.31

10

F-I s-a administrat sau în injecții intraperitoneale în 2% de gumă arabică, sau oral. Compușii administrați oral sau se dizolvau, sau erau suspensionați în 0,2 ml de ulei de porumb. Fiecare administrare, inclusiv cele de control de gumă arabică și ulei de porumb, s-a realizat o dată zilnic fiecărui animal experimental. După măsurarea inițială a tumorii și selectarea animalelor experimentale, tumoarea s-a măsurat săptămânal prin metoda menționată anterior. Tratarea și măsurările s-au continuat în decurs de 3...5 săptămâni, timp în care se determinau dimensiunile finale ale tumorii. Pentru fiecare tratament cu compuși și de control, s-au înregistrat modificările dimensiunii medii a tumorii.

Metode de testare a fibrozei uterine

Testul 1: La femeile, în număr de 3...20, cu fibroză uterină s-a administrat F-I. Cantitatea de compus a constituit de la 0,1 la 1000 mg/zi, iar perioada de administrare - 3 luni. Pentru elucidarea efectului compusului în fibroza uterină femeile s-au aflat sub observație în perioada administrării compusului și până la 3 luni după sistarea tratamentului.

Testul 2: S-a utilizat metoda din testul 1, cu excepția că perioada de administrare a compusului a constituit 6 luni.

Testul 3: S-a utilizat metoda din testul 1, cu excepția că perioada de administrare a compusului a constituit 1 an.

Testul 4: Pentru inducerea leiomiomului la femelele sexual mature de cobai s-a folosit stimularea prelungită cu estrogene. Estaradiolul s-a administrat la animale în injecții de 3-5 ori pe săptămână timp de 2-4 luni sau până au apărut tumorile. Tratamentul, constând din F-I sau purtător, s-a administrat zilnic timp de 3-16 săptămâni, iar apoi animalele erau sacrificate, se preleva uterul și se studia regresivitatea tumorii.

Testul 5: Țesutul de leiomiom uman s-a implantat în cavitatea peritoneală și/sau în miometrul uterin al femelei sexual mature castrate, de șoareci fără timus. Estrogenul exogen s-a administrat pentru a induce creșterea țesutului explantului. În unele cazuri celulele tumorale colectate s-au cultivat *in vitro* până la implantare. Tratamentul, constând din F-I sau purtător, s-a furnizat prin spălături gastrice zilnic timp de 3-16 săptămâni, apoi implanturile s-au eliminat și s-a apreciat creșterea sau regresivitatea. În timpul sacrificării uterul s-a prelevat pentru a evalua starea organului.

Testul 6: S-a prelevat țesut din tumorile fibroase uterine umane, care s-a menținut *in vitro* în calitate de culturi primare netransformate. Preparatele chirurgicale s-au trecut printr-o celulă sau un ciur steril sau, în mod alternativ, cu un ac s-a prelevat țesut din regiunile adiacente, pentru a obține o suspensie celulară omogenă. Celulele s-au menținut în mediu cu conținut de 10% ser și antibiotic. S-a determinat viteza creșterii în prezența estrogenului și fără el. S-a studiat abilitatea celulelor de a produce componentul C-3 al complementului și răspunsul lor la factorii de creștere și hormonii de creștere. *In vitro* s-a estimat răspunsul proliferativ al culturilor la tratamentul cu progestine, GnRH, F-I și purtători. Săptămânal s-au determinat nivelele receptorilor hormonilor steroizi, pentru a determina dacă se mențin *in vitro* caracteristicile importante ale celulelor. S-a utilizat țesutul de la 5-25 pacienți.

Testul 7: S-a determinat abilitatea F-I de a inhiba proliferarea, stimulată de estrogen, a liniei celulare ELT, obținută din leiomiom prin metoda descrisă de Fuchs-Young et al., "Inhibition of Estrogen-Stimulated Growth of Uterine Leiomyomas by Selective Estrogen Receptor Modulators" Mol. Car., 17 (3):151-159 (1996) [5], recomandările căruia sunt încorporate în descriere prin referințe.

Metoda de testare a endometrozei

Testul 1: În calitate de animale experimentale s-au folosit între 12 și 30 femele mature de șobolani, linia CD. Șobolani au fost repartizați în trei grupuri egale. La toate animalele se afla sub control ciclul estral. În ziua proestrului femelele erau operate. La femelele din fiecare grup s-a extirpat cornul uterin stâng, cornul s-a secționat în bucăți pătrate nu prea mari, aceste pătrate fiind aleatoriu suturate în diferite sectoare adiacente fluxului sangvin mezenteric. În plus, la femelele din grupul 2 s-au extirpat ovarele. Din ziua următoare după operație femelele din grupul 1 și 2 s-a administrat intraperitoneal apă timp de 14 zile, animalelor din lotul 3 - intraperitoneal 1,0 mg de F-I la kg de masă corporală aceeași perioadă de timp. Peste 14 zile de tratament fiecare femelă a fost sacrificată, s-au extirpat explanturile endometriale, suprarenalele, partea restantă a uterului și ovarelor, ceea ce era posibil, s-au pregătit pentru examenul histologic, ovarele și suprarenalele s-au cântărit.

Testul 2: În calitate de animale experimentale s-au folosit între 12 și 30 de femele mature de șobolani linia CD. Șobolani au fost repartizați în două grupuri identice. Ciclul estral la toate animalele era sub control. În ziua proestrului fiecare femelă era operată. La femelele din fiecare grup s-a extirpat cornul uterin stâng, care s-a secționat în bucăți pătrate nu prea mari, aceste pătrate fiind aleatoriu suturate în diferite sectoare adiacente fluxului sangvin mezenteric. Peste circa 50 zile după operație animalelor din grupul 1 s-a administrat intraperitoneal apă timp de 21 zile, animalelor din lotul 2 - intraperitoneal 1,0 mg de F-I la kg de masă corporală aceeași perioadă de timp. Peste 21 zile de tratament fiecare femelă a fost sacrificată, iar explanturile endometriale și suprarenalele s-au extirpat și cântărit. Explanturile s-au apreciat ca indicator al creșterii. Ciclurile estrale erau sub control.

Testul 3: Pentru inducerea endometriozei la șobolani și/sau iepuri s-au folosit autogrefe de țesut endometrial. Animalele - femele la maturitate reproductivă, - erau supuse ovariectomiei bilaterale, iar estrogenul se compensa exogen, asigurând astfel un anumit și constant nivel de hormon. La 5-150 animale țesutul endometrial autolog s-a implantat în peritoneu și s-au asigurat cu estrogen, pentru a induce creșterea țesutului explantat. Tratamentul,

MD 2336 F2 2003.12.31

11

constând din compusul, conform prezentei invenții, s-a realizat prin spălături gastrice zilnic timp de 3-16 săptămâni, implanturile s-au eliminat și s-a apreciat creșterea sau regresivitatea. În cadrul sacrificării s-a prelevat cornul uterin intact, pentru aprecierea stării endometrului.

5 Testul 4: Țesutul din sectoarele patologice ale endometrului uman s-au implantat în peritoneul femelelor sexual mature castrate de șoareci fără timus. Ele erau asigurate cu estrogen exogen, pentru a produce creșterea țesutului explant. În unele cazuri celulele endometriale prelevate s-au cultivat. Tratamentul, constând din F-I, s-a realizat prin spălături gastrice zilnic timp de 3-16 săptămâni, implanturile s-au eliminat și s-a apreciat creșterea sau regresivitatea. În cadrul sacrificării s-a extirpat uterul, pentru aprecierea stării endometrului intact.

10 Testul 5: Țesutul din sectoarele deteriorate ale endometrului uman s-a colectat și s-a menținut *in vitro* în calitate de culturi netransformate. Preparatele chirurgicale s-au trecut printr-o celulă sau un ciur steril sau, în mod alternativ, cu un ac s-a prelevat țesut din regiunile adiacente, pentru a obține o suspensie din celule de același tip. Celulele s-au menținut în mediu cu conținut de 10% ser și antibiotic. S-a determinat viteza creșterii în prezența estrogenului și fără el. S-a studiat abilitatea celulelor de a produce componentul C-3 al complementului, precum și răspunsul celulelor la factorii de creștere și hormonii de creștere. *In vitro* după tratamentul cu progesteron, GnRH, F-I și purtători s-a estimat răspunsul proliferativ al culturilor. Săptămânal s-au determinat nivelele receptorilor hormonilor steroizi, pentru a determina persistența *in vitro* a caracteristicilor importante ale celulelor. S-a utilizat țesutul de la 5-25 pacienți.

Tulburările SNC, inclusiv boala Alzheimer

20 Estrogenele, cum ar fi 17 β -estradiol, reglează transcrierea genică prin conjugarea cu receptorii estrogenici (RE), care se află în citoplasma unor anumite populații de celule. Activarea RE de către ligandă este premisă pentru transportul complexului în nucleu, în care conjugarea cu succesiunea corespunzătoare de 13 perechi de baze ale ADN palindromic (elementul răspunsului estrogenului sau ERE) generează procesul asamblării aparatului transcripțional, care atinge culminația la activarea genelor-țintă respective. Au fost identificate numeroase gene, care sunt reglate de estrogeni. Ele includ proteinele citoscheletale, enzimele biosintezei neurotransmițătorilor, enzimele metabolismului și receptorii, precum și alți hormoni și neuropeptide. Elementele ERE s-au identificat în numeroase gene estrogen- pozitive, inclusiv vitelogenina, c-fos, prolactina și hormonul luteinizant.

25 Succesiunile ERE similare, cu semnificație majoră pentru sistemul nervos central, au fost identificate în p75^{NGF} și trkA, ambele servind ca molecule de semnalizare pentru neurotrofine: factorul de creștere a nervilor (NGF), factorul neurotrofic derivat din encefal (BDNGF) și neurotrofina-3.

30 S-a constatat că BDNF, la fel ca și NGF, amplifică vitalitatea neuronilor colinergici în cultură. Se presupune că interacțiunea între neurotrofine și estrogene este importantă pentru evoluția și vitalitatea neuronilor bazali ai prosencefalului (care degenerază în boala Alzheimer) în acele stări clinice, în care deficiența existentă de estrogen (după menopauză) poate contribui la pierderea acestor neuroni.

35 Experimentul următor s-a realizat pe șobolanii ovariectomizați (preparați prin metoda descrisă anterior) pentru a determina similitudinea și/sau deosebirea în influența F-I și estrogenului asupra expresiei genei în variate regiuni ale creierului. Șobolanilor în vârstă de șase săptămâni zilnic li s-a administrat în injecții subcutanate estradiol benzoat (0,03 mg/kg), F-I și un purtător (control). Peste cinci săptămâni de tratament, animalele erau sacrificate, s-a extirpat creierul și prin microdisecție s-a prelevat hipocampusul. Hipocampusul s-a congelat rapid în azot lichid și s-a păstrat la -70°C. ADN total s-a obținut din țesutul asociat al animalelor din grupurile cu tratament corespunzător și din grupul de control și s-a efectuat transcrierea inversă, utilizând primerul 3'-oligonucleotid, selectat pentru populațiile de ARNm specifici (poli-A+). Reacțiile polimerazei în lanț (PCR) s-au condus în coctailuri, constând din: 5'-oligonucleotide accidentale (cu lungimea de 10 perechi de baze; total - 150), tampon de reacție, Tagpolimerază și ³²PdTCP.

45 După 40 de cicluri de amplificare, produsele reacției s-au fracționat, în funcție de dimensiuni, în 6% gel TBE-uree, s-au uscat și s-au expus pe peliculă radiologică. Tablourile repartizării ARNm s-au comparat între grupuri.

Utilizarea F-I în asociere cu estrogen

50 Se cunoaște că femeile în perioada pre- și postmenopauză deseori recurg la tratament hormonal de substituție (THS), pentru a evita consecințele negative asociate cu reducerea nivelului de estrogen endogen circulator, de exemplu, pentru tratamentul acceselor de bufeuri de căldură. Însă, THS poate să se asocieze cu un risc înalt de apariție a anumitor forme de cancer, inclusiv cancer uterin și mamar. F-I poate fi administrat în asociere cu THS pentru inhibarea acestor procese.

Utilizarea F-I în asociere cu inhibitorul aromatazei

55 Conform definiției, la femeile în postmenopauză ovarele nu funcționează. Singura sursă de estrogene la ele este conversia androgenilor suprarenalelor până la estrogen cu enzima aromataza, care se detectează în țesuturile periferice (inclusiv în țesutul adipos, mușchi și în însăși tumoarea glandei mamare). Astfel, la femeile în postmenopauză medicamentele care inhibă aromataza (inhibitorii aromatazei) epuizează estrogenul circulant. Depleția estrogenului prin inhibarea aromatazei este o posibilitate de semnificație majoră în tratamentul pacientelor cu cancer mamar metastatic. În cadrul tratamentului cu inhibitorii aromatazei absența estrogenului circulant poate

MD 2336 F2 2003.12.31

12

avea efecte negative, de exemplu, la nivelul lipidelor serice. Pentru prevenirea acestor efecte negative se poate administra F-I.

Utilizarea F-I în asociere cu analogul LHRH

5 Acțiunea continuă a analogului LHRH (hormonului care eliberează hormonul luteinizant) inhibă producerea estrogenului la femeile în postmenopauză, desensibilizând hipofiza, care apoi nu mai stimulează ovarele pentru producerea estrogenului. Efectul clinic se manifestă ca “ovariectomie medicamentoasă”, care este reversibilă la suspendarea analogului LHRH. În cadrul tratamentului cu analogul LHRH, absența estrogenului circulant poate fi cauza unor efecte negative, efecte secundare neprevăzute, de exemplu, influența asupra nivelului de lipide serice. F-I se poate folosi pentru inhibarea acestor efecte negative.

Creșterea nivelului de acetilcolină

15 Este cunoscut că la pacienții cu boala Alzheimer se înregistrează declinul semnificativ al nivelului de neuroni colinergici în hipocamp, comparativ cu semenii lor care nu suferă de această boală. S-a constatat că la acești pacienți reducerea progresivă a acestor neuroni colinergici reflectă pierderea memoriei și funcțiilor cognitive. Se presupune că cauza reducerii numărului de acești neuroni este pierderea sau diminuarea funcției acetilcolinei neurotransmițătorilor.

20 Nivelul de acetilcolină în neuron, în general, se determină în funcție de direcția în care se modifică echilibrul între biosinteză și biodegradare. Enzima colin-acetiltransferaza (ChAT), în general, este responsabilă de sinteza acetilcolinei, iar acetilcolinesteraza (AChE) – de degradarea ei.

25 Pentru studierea influenței F-I asupra nivelului de ChT s-a efectuat următorul experiment: după prepararea șobolanilor prin metoda descrisă mai sus, la 40 de șobolani zilnic li s-au administrat în injecții subcutanate și *per os* printr-o sondă gastrică câte 3 mg/kg/zi de F-I într-un purtător cu conținut de 10% ciclodextrină, estradiol benzoat în cantitate de 0,03 sau 0,3 mg/kg/zi sau purtător control. Animalele au fost tratate între 3 și 10 zile. Au fost folosite douăsprezece animale pentru fiecare schemă de tratament. La intervale corespunzătoare de timp, animalele se sacrificau și se diseca creierul lor. Anumite porții de creier se omogenizau și se examinau. Omogenatele hipocampului și părții frontale a cortexului cerebral s-au tratat și în ele s-a determinat activitatea ChAT prin analiza radioactivității biosintezei acetilcolinei. Această metodă poate fi examinată în J. Neural Transmiss, 78:183-193, 1989 [6], care este încorporată în descriere prin referințe.

30 Cum s-a presupus, la animalele OVX nivelurile de ChAT sunt reduse cu >50% ($p < 0,001$), comparativ cu controalele fictiv operate.

35 Într-un alt aspect al prezentei invenții, F-I s-a administrat în asociere cu inhibitorul AChE. Utilizarea inhibitorului AChE, grație blocării degradării ei prin inhibarea AChE, conducea la creșterea nivelului de acetilcolină.

Hiperplazia benignă a prostatei (HBP)

Preistoric problema relației între acțiunea estrogenului și tratamentul HBP și carcinomului prostatei este cunoscut [7].

40 În experimentele descrise în continuare, pe câteva linii celulare de cancer de prostată uman s-a estimat abilitatea F-I de a conjuga receptorii estrogenului.

Lizatele liniilor celulare LNCaP, DU-45 și PC-3 de cancer de prostată uman s-au preparat în mediul TGE cu conținut de 50 mM tris-HCl; pH 7,4; 1,5 mM acid etilendiamintetraacetic (EDTA); 0,4 M KCl; 10% glicerină; 0,5 mM 2-ME și 10 mM molibdat de sodiu, conținând adițional inhibitorii proteazelor: pepstatina (1 mg/ml), leupeptina (2 mg/ml), aprotinina (5 mg/ml) și fluorura de fenilmetilsulfonil (PMSF, 0,1 mM) (TEGP).

45 Lizatele celulare s-au centrifugat, precipitatul s-a resuspendat în TEGP rece (1 ml TEGP/100 mg precipitat) și s-a sonificat timp de 30 secunde (sarcina ciclului 70%, potențialul 1,8) cu dispozitivul ultrasonor Branson, modelul 450. Lizatele s-au sedimentat prin centrifugare cu 10000 x g pentru 15 minute la 4°C, apoi supernatantul s-a separat și s-a folosit imediat, sau se depozita la -70°C.

50 Testul de conjugare competitiv: În calitate de tampon de conjugare s-a utilizat TEG, în care 0,4 M KCl s-a substituit cu 50 mM NaCl și în care s-a mai adăugat 1 mg/ml de ovalbumină (TEGO). F-I s-a diluat până la 20 nM în TEGO, din care s-au preparat diluții triple în serie. Testările s-au realizat pe microplășete de polipropilenă cu fundul plat în microalveole triplate. În fiecare alveolă s-au introdus 35 ml de 17 β -estradiol marcat cu tritiu (0,5 nM, activitatea specifică 60,1 Ci/mmol, DuPont-New England Nuclear, Boston, MA) și 35 ml de compus testat răcit (0,1 nM – 5 mM) sau TEGO, după incubare pentru 5 minute la 4°C cu agitare s-au adăugat 70 ml de lizat de linie celulară MCE-7.

55 Plășetele s-au incubat pentru 24 ore la 4°C, apoi în fiecare alveolă s-au adăugat 70 ml de cărbune de lemn acoperit cu dextran (DCC) cu o agitare ulterioară energetică timp de 8 minute la 4°C. Plășetele s-au centrifugat apoi la 1500xg timp de 10 minute la 4°C. Supernatantul s-a colectat din fiecare alveolă într-o microplășetă de polistiren flexibilă pentru numărarea scintilațiilor cu contorul Wallac Micobeta Model 1450. Radioactivitatea s-a exprimat în dezintegrări/minut (DPM) după corecția în funcție de eficiența numărării (35-40%) și fon. Pentru determinarea limitei inferioare a numărării DCC extractibile, drept controale suplimentare au servit numărările totale și

MD 2336 F2 2003.12.31

13

numărările totale + DCC. Rezultatele acestei conjugări competitive s-au exprimat ca procent mediu al conjugării (% conjugării) ± devierea standard, utilizând formula:

$$\% \text{ conjugării} = \frac{DPM_{\text{compusul testat}} - DPM_{\text{total}} + DCC}{DPM_{\text{fara compus testat}} - DPM_{\text{total}} + DCC} \times 100$$

5

Prevenirea cancerului mamar

Prezenta invenție se referă de asemenea la administrarea F-I recipientului, care face parte din grupul de risc de apariție *de novo* a cancerului mamar. Termenul “*de novo*” definește, în primul rând, absența transformării sau metamorfozei celulelor normale ale glandei mamare în celule canceroase sau maligne. O astfel de transformare se poate produce în stadii în aceleași celule sau în celulele fiice printr-un proces evolutiv sau poate evolua ca un proces central aparte. Acest proces *de novo* diferă de metastazarea, colonizarea sau răspândirea celulelor de acum transformate sau malignizate din tumoarea primară în sectoare noi de localizare.

10

Persoana, care nu face parte din grupul cu un risc înalt de instituire a cancerului mamar, este acea la care se poate dezvolta *de novo* cancer mamar, care nu prezintă nici un fel de simptome sau suspiciuni în ce privește probabilitatea afecțiunii în afara riscului obișnuit și la care niciodată nu s-a diagnosticat boala. Factorul major de risc, care contribuie la dezvoltarea carcinomului mamar, este istoricul vieții persoanei care suferă de această boală sau prezența în antecedente a manifestărilor care preced afecțiunea, chiar dacă în prezent se află în remisiune fără de oricare simptome de prezență a ei. Un alt factor de risc este prezența unei așa patologii în antecedentele eredocolaterale familiale.

15

20

Inducția tumorii mamare la șobolani prin administrarea cancerigenului N-nitroso-N-metiluree este un model bine cunoscut pentru studierea cancerului mamar și se consideră potrivit pentru analiza efectelor agenților chimioprolifacții.

25

În două studii diferite, femelelor de șobolani Sprague-Dawley în vârstă de 55 zile s-a administrat intravenos (Studiul 1) sau intraperitoneal (Studiul 2) N-nitroso-N-metiluree în doză de 50 mg la kilogram de masă corporală o săptămână până la accesul *ad libitum* la hrană, în care s-au adăugat variate cantități de F-I, bază de (Z)-2-[4-(1,2-difenil-1-butenil)fenoxi]-N,N-dimetiletanamină (bază de tamoxifen) sau control.

În studiul 1 dozele dietetice de 60 mg/kg și 20 mg/kg de hrană au fost transformate în doze brute comparabile de 3 și 1 mg/kg de masă corporală pentru fiecare animal.

30

În studiul 2 dozele dietetice de 20, 6, 2 și 0,6 mg/kg de hrană au fost transformate în doze brute comparabile de 1; 0,3; 0,1 și 0,03 mg/kg de masă corporală pentru animalele experimentale.

Șobolani au fost observați în ceea ce privește manifestările toxicității și o dată în săptămână erau cântăriți și palpați pentru a determina formarea de tumori. Peste treisprezece (studiul 1) sau optsprezece săptămâni (studiul 2) animalele erau sacrificate, la autopsie se confirma prezența tumorii și se cântăreau.

35

Compoziții

Termenul “farmaceutic”, utilizat ca adjectiv, în esență se definește ca nedăunător pentru recipientul mamifer. Termenul de “compoziție farmaceutică” prevede că purtătorul, diluantul, excipienții și ingredientele (ingredientele) activ (active) trebuie să fie compatibile cu alte ingrediente ale compoziției și să nu fie nocive pentru recipient. Mai potrivită este introducerea lui F-I în compoziție până la administrare. Selecția compoziției trebuie să o facă medicul curant în funcție de aceiași factori, care au fost incluși în definiția de cantitate eficientă.

40

Ingredientele active sumare într-o astfel de compoziție constituie de la 0,1 la 99,9% din greutatea compoziției. În compoziția menționată mai potrivită este includerea a nu mai mult de două ingrediente active. Astfel, este potrivită includerea în compoziție a F-I în asociere cu un alt ingredient activ, selectat din estrogen, progestină, un inhibitor al aromatazei, un analog al LHRH și un inhibitor al AChE. Mai potrivite sunt compozițiile, în care F-I este singurul ingredient activ.

45

Compozițiile farmaceutice, conform prezentei invenții, se prepară prin procedee cunoscute în domeniu, utilizând ingrediente bine cunoscute și ușor disponibile. De exemplu, F-I, sau de unul singur sau în asociere cu estrogen, progestină, un inhibitor al aromatazei, un analog al LHRH și un inhibitor al AChE se formulează cu excipienți, diluanți sau purtători obișnuiți în formă de tablete, capsule, suspensii, soluții, compoziții injectabile, aerosoli, prafuri etc.

50

Compozițiile farmaceutice, conform prezentei invenții, pentru administrare parenterală conțin soluții, dispersii, suspensii sau emulsii apoase sau neapoase sterile, precum și prafuri sterile, care se reconstituie înainte de utilizare în soluții sau suspensii sterile. Exemplele de purtători, diluanți, solvenți sau excipienți sterili apoși sau neapoși includ: apă, soluție salină fiziologică, etanol, polioli (cum ar fi glicerina, propilenglicol, poli(etilenglicol) etc.) și amestecurile lor potrivite; uleiuri vegetale (cum ar fi ulei de măsline) și esteri organici injectabili, cum ar fi oleat de etil. Fluiditatea necesară se menține, de exemplu, prin folosirea materialelor de acoperire, cum ar fi lecitina, prin crearea unor dimensiuni potrivite ale particulelor, în cazul dispersiilor și suspensiilor, și utilizarea substanțelor tensioactive.

55

MD 2336 F2 2003.12.31

14

Compozițiile parenterale de asemenea pot conține adjuvanți, cum ar fi conservanți, agenți de umectare, agenți de emulsionare și dispersanți. Prevenția acțiunii microorganismelor se asigură prin includerea agenților antibacterieni și antifungici, de exemplu, paraben, clorbutanol, acidul fenolsorbic etc. Este dezirabilă de asemenea includerea agenților izotonici, cum ar fi zaharuri, clorură de sodiu etc. Prolongarea absorbției compozițiilor injectabile se realizează prin includerea agenților, care frânează absorbția, cum ar fi monostearat de aluminiu și gelatină.

În unele cazuri pentru prolongarea efectului substanței medicamentoase este dezirabilă diminuarea absorbției medicamentului după administrare subcutanat sau intramuscular. Aceasta se poate realiza prin utilizarea unei suspensii lichide de substanță cristalină cu o solubilitate joasă sau prin suspensionarea substanței medicamentoase într-un purtător uleios. În cazul injectării subcutanat sau intramuscular a unei suspensii cu conținut de substanță medicamentoasă cu o solubilitate joasă în apă, viteza absorbției medicamentului depinde de viteza lui de dizolvare.

Compozițiile injectabile "depozite" de F-I se obțin prin formarea matricelor microîncapsulate de medicament în polimeri biodegradabili, cum ar fi poli(acid lactic), poli(acid glicolic), copolimeri ai acidului lactic și glicolic, poli(ortoesterii) și poli(anhidridele) acestor substanțe, descrise în domeniu. În funcție de raporturile de substanță medicamentoasă și polimer și proprietățile polimerului utilizat aparte, poate fi controlată eliberarea medicamentului.

Compozițiile injectabile se sterilizează, de exemplu, prin filtrare printr-un filtru antibacterian sau presterilizarea compozițiilor compoziției până la fuzionarea lor, sau în timpul producerii, sau nemijlocit înainte de administrare (în seringă-ambalaj cu două camere).

Formele dozate solide pentru administrare orală includ: capsule, tablete, pastile, prafuri și granule. În astfel de forme dozate solide, F-I se amestecă, cel puțin, cu un purtător farmaceutic inert, cum ar fi clorura de sodiu sau dicalciu fosfat și/sau a) cu diluanți sau umpluturi uscate, cum ar fi amidon, zaharuri, inclusiv lactoză și glucoză, manitol și acid silicic; b) lianți, cum ar fi carboximetilceluloza și alți derivați ai celulozei, alginat, gelatină, poli(vinilpirolidină), zaharoză și gumă arabică; c) umectori, cum ar fi glicerina; d) dispersanți, cum ar fi agar-agar, carbonat de calciu, bicarbonat de sodiu, amidon de cartofi sau tapioco, acid alginic, silicați și carbonat de sodiu; e) agent de umectare, cum ar fi glicerina; f) agenți care împiedică dizolvarea, cum ar fi parafina; g) agenți care accelerează absorbția, cum ar fi compușii de amoniu cuaternar; h) emolienți, cum ar fi alcool cetilic și monostearat de glicerină; i) absorbant, cum ar fi caolina și bentonita și j) lubrifianți, cum ar fi talc, stearat de calciu, stearat de magneziu, poli(etilenglicol) solid, lauril sulfat de sodiu și amestecurile acestora. În cazul capsulelor, tabletelor și pastilelor formele dozate de asemenea pot conține tamponare.

Compozițiile solide de tip similar pot conține de asemenea umplutură pentru capsule de gelatină moi sau tari, utilizând așa excipienți, cum ar fi lactoza, precum și poli(etilenglicoli) macromoleculari.

Formele dozate solide, cum ar fi tabletele, drajeurile, capsulele, pastilele și granulele, de asemenea pot fi preparate cu învelișuri, cum ar fi învelișuri enterice sau alte învelișuri bine cunoscute în tehnologia preparării medicamentelor. Învelișurile pot conține agenți, care opacifiază substanțele, sau agenți care eliberează ingredientul (ingredientele) activ (e) într-un anumit segment al tractului digestiv, de exemplu, învelișurile solubile în acid pentru eliberarea ingredientului (ingredientelor) activ (e) în stomac sau învelișuri solubile în baze – pentru eliberarea ingredientului (ingredientelor) activ (e) în intestine.

Ingredientul (ingredientele) activ (e) pot fi de asemenea microîncapsulate în învelișuri cu eliberare lentă, microcapsulele fiind parte a tabletei sau capsulei.

Formele dozate lichide de F-I pentru administrare orală includ soluție, emulsii, suspensii, siropuri sau elixire. Adicional la compușii activi, formulările lichide mai pot include diluanți inerti, folosiți de obicei în acest domeniu, cum ar fi apa sau alți solvenți farmaceutici, agenți de solubilizare și agenți de emulsifiere, cum ar fi etanol, izopropanol, etilcarbonat, acetat de etil, alcool benzilic, benzilbenzoat, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamidă, uleiuri (în special, ulei de bumbac, arahide, porumb, semințe, măsline, ricin și sesam), glicerină, alcool tetrahidrofurfurilic, poli(etilenglicoli), esteri ai acizilor grași ai sorbitei și amestecurile lor.

Adițional la diluanții inerti, formele lichide de compoziții mai pot include adjuvanți, cum ar fi umectanți, agenți de emulsifiere și de suspensionare, agenți de îndulcire, gustativi și aromatizanți.

Suspensiile lichide, adițional la ingredientul (ingredientele) activ (e) mai pot conține agenți de suspensionare, cum ar fi alcooli etoxilați izostearili, polioxietilensorbit și esteri ai sorbitanului, celuloză microcristalină, metahidroxid de aluminiu, bentonită, agar-agar, tragacant și amestecurile lor.

Compozițiile pentru aplicare rectală sau intravaginal se obțin prin fuzionarea F-I cu excipienți potriviți, care nu irită, cum ar fi unt de cacao, polietilenglicol sau altă ceară pentru supozitoare, care se menține solidă la temperatura camerei, însă se lichefiază la temperatura corpului și, astfel, se topește în rect sau în cavitatea vaginului cu eliberarea compusului (compușilor) activ (i). Compușii se dizolvă în ceară topită, se formulează în forma necesară și se lasă să se solidifice în compoziția finală pentru supozitoare.

F-I, de asemenea, poate fi administrat în formă de lipozomi. Este cunoscut în acest domeniu, că lipozomii de obicei se prepară din fosfolipide sau alte substanțe lipide. Compozițiile lipozomice se formează cu cristale lichide hidratate mono- sau pluristratificate, care dispersează într-un mediu apos. Se poate folosi orice lipidă farmaceutic netoxică și metabolizantă, capabilă să formeze lipozomi. Aceste compoziții în formă de lipozomi pot conține,

MD 2336 F2 2003.12.31

15

adițional la F-I, stabilizatori, excipienți, conservanți etc. Lipidele potrivite sunt fosfolipidele și fosfatidilcolinele (lecitine), atât naturale, cât și sintetice.

Procedeele de formare a lipozomilor sunt cunoscute în domeniu și descrise, de exemplu, în Prescott, Ed., Methods in Cell Biology, Volume XIV, Academic Press, New York, (1976), p.33 și următoarele.

5 Exemplele următoare de compoziții numai ilustrează prezenta invenție și nu restrâng volumul ei revendicat.

Compoziția 1: Capsule de gelatină

Capsule solide de gelatină preparate cu utilizarea următoarelor: Ingredient	Cantitatea (mg/capsulă)
F-I	0,1-1000
Amidon, Farmacopea Națională a S.U.A.	0-650
Amidon, praf fluid	0-650
Silicon fluid 350 centistox	0-15

Compoziția menționată poate fi modificată în conformitate cu modificările rezonabile propuse.

Compoziția tabletată se prepară cu utilizarea ingredientelor prezentate în continuare:

10

Compoziția 2: Tablete

Ingredient	Cantitatea (mg/tabletă)
F-I	2,5-1000
Celuloză, microcristalină	200-650
Dioxid de silicon, fumigant	10-650
Acid stearic	5-15

Componentele se fuzionează și se presează cu formarea tabletelor.

Compoziția 3: Tabletele cu conținut de circa 10 și 50 mg de F-I se pot prepara după cum urmează:

Ingredient	Cantitatea (mg/tabletă)	Cantitatea (mg/tabletă)
F-I	11,3	56,5
Lactoză anhidră	176,8	128,2
Lactoză, uscată prin pulverizare	44,2	32,0
Povidon	11,0	13,0
Polisorbat 80	2,5	2,6
Crospovidon (interior)	6,25	6,24
Crospovidon (exterior)	6,25	6,5
Stearat de magneziu	1,5	1,7
Celuloză microcristalină (exterior)	0,0	13,0

15

Componentele se fuzionează și se presează cu formarea tabletelor.

În mod alternativ, tabletele, fiecare cu conținut de 2,5-1000 mg de F-I, se pot obține în modul ce urmează:

Compoziția 4: Tablete

Ingredient	Cantitatea (mg/tabletă)
F-I	25-1000
Amidon	45
Celuloză, microcristalină	35
Polivinilpirolidon (în formă de 10% soluție în apă)	4
Sodiucaboximetilceluloză	4,5
Stearat de magneziu	0,5
Talc	1

20

F-I, amidonul și celuloza se cern printr-un ciur nr. 45 meș US și se agită energic. Soluția de polivinilpirolidon se amestecă cu prafurile obținute, apoi se cerne printr-un ciur nr. 14 meș US. Granulele astfel obținute se usucă la 50-60°C și se cern printr-un ciur nr. 18 meș US. Sodiucaboximetilamidonul, stearatul de magneziu și talcul, trecute în prealabil printr-un ciur nr. 60 meș US, sa adaugă apoi la granule care, după agitare, se presează cu un dispozitiv de preparare a tabletelor cu formarea tabletelor.

25

Suspensiile, fiecare dintre ele conținând 0,1-1000 mg de substanță medicamentoasă în 5 ml de formă dozată, se prepară în modul ce urmează:

30

MD 2336 F2 2003.12.31

16

Compoziția 5: Suspensii

Ingredient	Cantitatea (mg/ml)
F-I	0,1-1000 mg
Sodiucaboximetilceluloză	50 mg
Sirop	1,25 mg
Soluție de acid benzoic	0,10 ml
Substanță gustativă	cantitate suficientă
Colorant	cantitate suficientă
Apă purificată până la	5 ml

5 Medicamentul se cerne prin ciurul nr. 45 meș US și se fuzionează cu sodiucaboximetilceluloza și siropul cu formarea unei paste omogene. Soluția de acid benzoic, substanța gustativă și colorantul se diluează cu o cantitate oarecare de apă și se adăunează cu agitare. Apoi se adaugă o cantitate suficientă de apă pentru a obține volumul necesar.

Soluțiile aerosol se prepară din următoarele ingrediente:

10

Compoziția 6: Aerosol

Ingredient	Cantitatea (% masice)
F-I	0,25
Etanol	25,75
Propelent 22 (clordifluometan)	70,0

F-I se amestecă cu etanolul și amestecul se adaugă la o porție de propelent 22, se răcește până la 30°C și se transferă în dispozitivul de umplere. Apoi, cantitatea necesară se introduce într-un container de oțel inoxidabil și se diluează cu propelentul restant. Dispozitivul valvular se assemblează la container.

15

Supozitoarele se prepară în modul ce urmează:

Compoziția 7: Supozitoare

Ingredient	Cantitatea (mg/supozitor)
F-I	250
Gliceride ale acizilor grași saturați	2000

20 F-I se cerne printr-un ciur nr. 60 meș US și se suspensionează în gliceride ale acizilor grași saturați, în prealabil topite, folosind o încălzire minimal necesară. Apoi amestecul se toarnă în forme pentru supozitoare cu capacitate nominală de 2 g și se lasă pentru răcire.

Compoziția pentru administrare intravenos se prepară în modul ce urmează:

Compoziția 8: Soluție pentru administrare intravenos

Ingredient	Cantitatea
F-I	25 mg
Soluție salină izotonică	1000 ml

25

Soluția de ingrediente menționate se administrează pacientului intravenos cu o viteză de circa 1 ml pe minut.

Compoziția 9: Capsulă, combinația 1

Ingredient	Cantitatea (mg/capsulă)
F-I	50
Premarin	1
Avicel pH 101	50
Amidon 1500	117,50
Ulei de silicon	2
Tvin 80	0,50
Cab-O-Sil	0,25

30

MD 2336 F2 2003.12.31

17

Compoziția 10: Capsulă, combinația 2

Ingredient	Cantitatea (mg/capsulă)
F-I	50
Noretinodrel	5
Avicel pH 101	82,5
Amidon 1500	90
Ulei de silicon	2
Tvin 80	0,50

Compoziția 11: Tabletă complexă

Ingredient	Cantitatea (mg/capsulă)
F-I	50
Premarin	1
Amidon de porumb, Farmacopea Națională a S.U.A.	50
Polidon, K29-32	6
Avicel pH 101	41,50
Avicel pH 102	136,50
Crospovidon XL10	2,50
Stearat de magneziu	0,50
Cab-O-Sil	0,50

5

Dozarea

O doză anumită de F-I, administrată conform prezentei invenții, se stabilește în funcție de circumstanțele deosebite, înregistrate în fiecare situație. Aceste circumstanțe includ: metoda de administrare, antecedentele bolii, starea patologică sau simptomele, care necesită aplicarea unui tratament, severitatea bolii/simptomului, care necesită un tratament, vârsta bolnavului și sexul recipientului.

10

De obicei, doza zilnică minimă eficientă pentru F-I constituie circa 1, 5, 10, 15 sau 20 mg. Doza maximă eficientă constituie circa 800, 100, 60, 50 sau 40 mg. Mai tipic, doza variază între 15 și 60 mg. Doza exactă poate fi stabilită în conformitate cu regula standard din practica medicală "titrarea dozei" recipientului, care constă în administrarea inițial a unei doze mici de compus și majorarea treptată a ei până la apariția efectului terapeutic desirabil.

15

Cu toate că poate este necesară titrarea dozei recipientului în ce privește tratamentul asociat examinat anterior, dozele tipice pentru ingredientele active, cu excepția F-I, s-au dovedit a fi următoarele: etinilestrogen (0,01-0,03 mg/zi), mestranol (0,05-0,15 mg/zi), hormonii estrogeni conjugați (de exemplu, Premarin[®], Wyeth-Ayerst, 0,3-2,5 mg/zi), medroxiprogesteron (2,5-10 mg/zi), noretinodrel (1,0-10,0 mg/zi), noretindronă (0,5-2,0 mg/zi), aminoglutemida (250-1250 mg/zi, de preferință, 250 mg de patru ori pe zi), anastrozol (1-5 mg/zi, de preferință, 1 mg pe zi), letrozol (2,5-10 mg/zi, de preferință, 2,5 mg pe zi), formestan (250-1250 mg pe săptămână, de preferință, 250 mg de două ori pe săptămână), goserlin (3-15 mg/trei luni, de preferință 3,6-7,2 mg o dată în trei luni) și leuprolid (3-15 mg/lună, de preferință 3,75-7,5 mg o dată la fiecare lună).

20

Modul de administrare

25

F-I se poate administra prin diferite modalități, inclusiv oral, rectal, transdermal, subcutanat, intravenos, intramuscular și intranasal. Modul de administrare pentru fiecare agent cu conținut de estrogen și progesterină corespunde oricărei modalități cunoscute în domeniu. F-I, singur sau în asociere cu estrogen, progesterină sau un inhibitor al AChE, de obicei, se administrează într-o compoziție potrivită.

30

Compozițiile farmaceutice, conform prezentei invenții, pentru uz uman sau la mamifere (de exemplu, la canine, pisici, cai, porcine etc.) se pot administra oral, rectal, intranasal, parenteral, topic, transbucal sau sublingual, sau nazal. Termenul "administrare parenterală" se referă la modurile de administrare, care includ: intravenos, intraperitoneal, intrasternal sau intraarticular sau în infuzii.

Modul/durata administrării

35

Pentru majoritatea procedurilor conform prezentei invenții F-I se administrează permanent de la 1 la 3 ori pe zi sau atât de frecvent, cât este necesar, pentru a-i asigura recipientului o cantitate eficientă. Terapia ciclică poate fi benefică, în special, în tratamentul endometriozei sau poate fi de o eficiență înaltă în tratamentul acceselor acute de dureri în cadrul afecțiunii. În cazul restenozei tratamentul poate fi limitat doar la intervalele nu prea mari (1-6 luni) dintre procedurile curative, cum ar fi angioplastia.

40

MD 2336 F2 2003.12.31

18

(57) Revendicări:

1. Hidrat cristalin de hidrociorură de 6-hidroxi-3-(4-[2-(piperidin-1-il)etoxi]fenoxi)-2-(4-metoxifenil)benzo[b]tiofen (F-I), caracterizat prin următoarele reflexii ale radiațiilor X: $7,9\pm 0,2$; $10,7\pm 0,2$; $14,9\pm 0,2$; $15,9\pm 0,2$; $18,3\pm 0,2$ și $20,6\pm 0,2^\circ$ în 2θ , obținute cu o sursă de iradiere de cupru.
2. Compoziție farmaceutică care conține compusul cristalin, conform revendicării 1, unul sau mai mulți purtători, diluanți sau excipienți farmaceutici și opțional estrogen, opțional progestină, opțional un inhibitor al aromatazei, opțional un analog al hormonului care eliberează hormonul luteinizant (LHRH) și, opțional, un inhibitor al acetilcolinesterazei.
3. Compoziție, conform revendicării 2, **caracterizată prin aceea că** conține compusul cristalin, definit în revendicarea 1, unul sau mai mulți purtători, diluanți sau excipienți farmaceutici și estrogen.
4. Compoziție, conform revendicării 3, **caracterizată prin aceea că** estrogenul reprezintă Premarin®.
5. Compoziție, conform revendicării 2, **caracterizată prin aceea că** conține compusul cristalin, definit în revendicarea 1, unul sau mai mulți purtători, diluanți sau excipienți farmaceutici și progestină.
6. Compoziție, conform revendicării 5, **caracterizată prin aceea că** progestina se selectează din grupa, ce constă din noretindronel și noretindronă.
7. Compoziție, conform revendicării 2, **caracterizată prin aceea că** conține compusul cristalin, definit în revendicarea 1, unul sau mai mulți purtători, diluanți sau excipienți farmaceutici și un inhibitor.
8. Compoziție, conform revendicării 7, **caracterizată prin aceea că** inhibitorul acetilcolinesterazei se selectează din grupa, ce constă din salicilat de fizostigmină, hidrociorură de tacrin și hidrociorură de donepezil.
9. Compoziție, conform revendicării 2, **caracterizată prin aceea că** conține compusul cristalin, definit în revendicarea 1, unul sau mai mulți purtători, diluanți sau excipienți farmaceutici estrogen și progestină.
10. Utilizarea compusului, definit în revendicarea 1, pentru inhibarea stărilor patologice selectate din grupa ce include fibroză uterină, endometrioză, proliferarea celulelor musculare netede aortale, restenoză, cancer mamar, cancer uterin, cancer de prostată, hiperplazia benignă a prostatei, osteoporoză, afecțiuni cardiovasculare, hiperlipidemie, tulburări ale SNC și boala Alzheimer.
11. Utilizare, conform revendicării 10, pentru inhibarea cancerului mamar.
12. Utilizare, conform revendicării 11, modul de inhibare este profilaxia.
13. Utilizare, conform revendicării 10, pentru inhibarea cancerului ovarian.
14. Utilizare, conform revendicării 10, pentru inhibarea cancerului endometrial.
15. Utilizarea compusului, definit în revendicarea 1, pentru activarea colinacetyltransferazei la mamifere.
16. Procedeu de obținere a compusului, definit în revendicarea 1, care include cristalizarea hidrociorurii de 6-hidroxi-3-(4-[2-(piperidin-1-il)etoxi]fenoxi)-2-(4-metoxifenil)benzo[b]tiofen din tetrahidrofuran.

35

(56) Referințe bibliografice:

Șef-adjunct Direcție Inventii:	JOVMIR Tudor
Examinator:	EGOROVA Tamara
Redactor:	CANȚER Svetlana

MD 2336 F2 2003.12.31

19

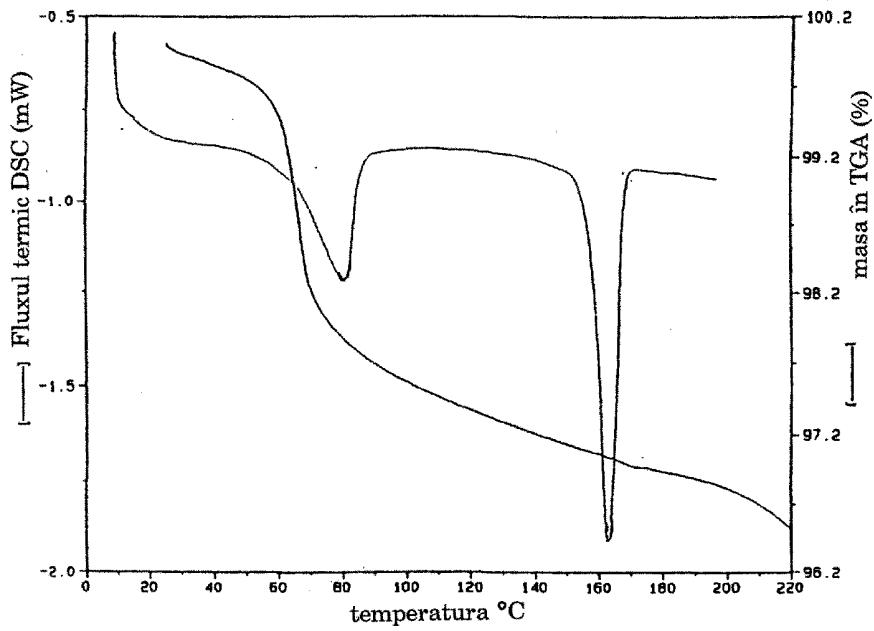


Fig. 1

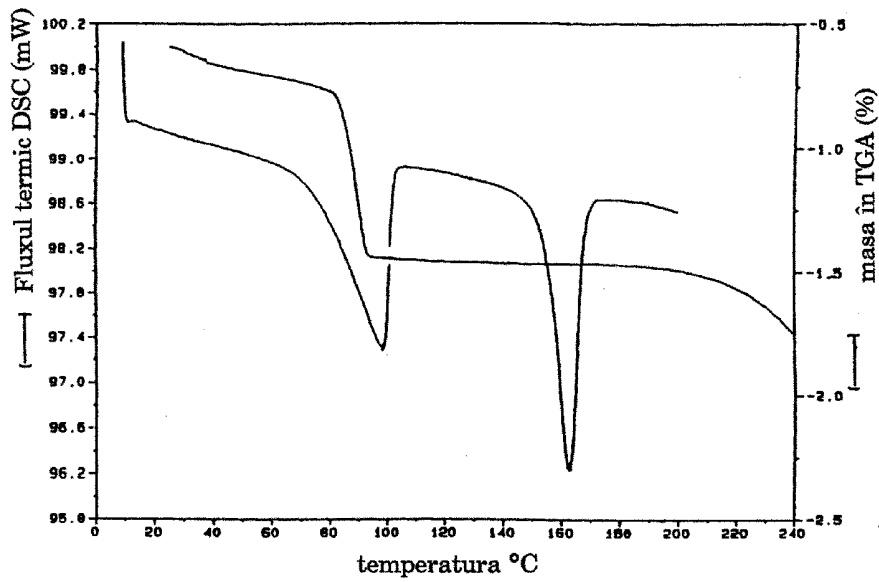


Fig. 2

MD 2336 F2 2003.12.31

20

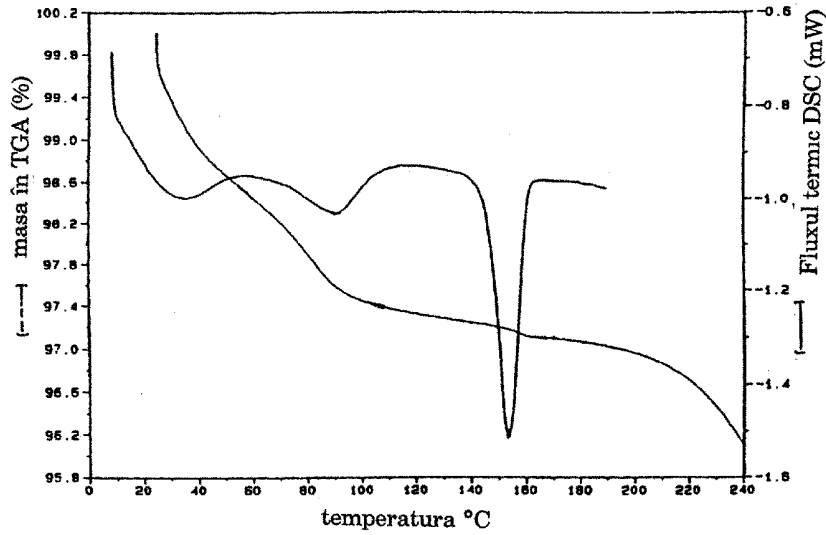


Fig. 3

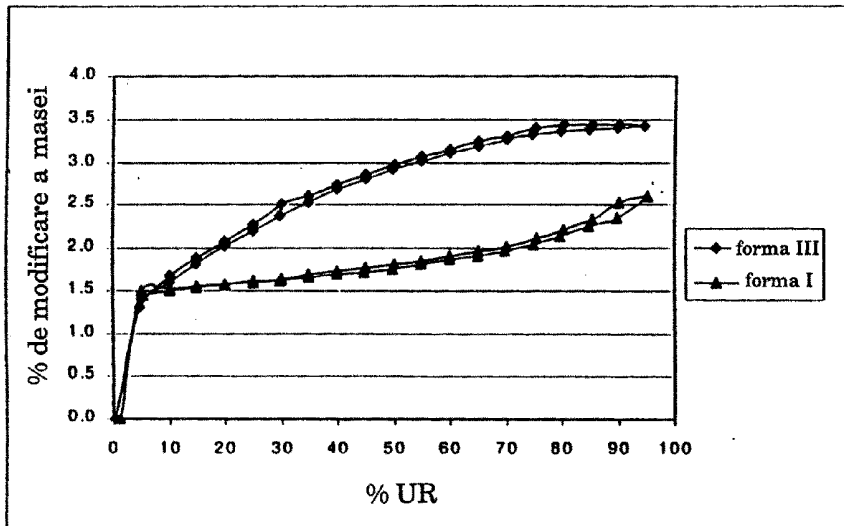


Fig. 4

MD 2336 F2 2003.12.31

21

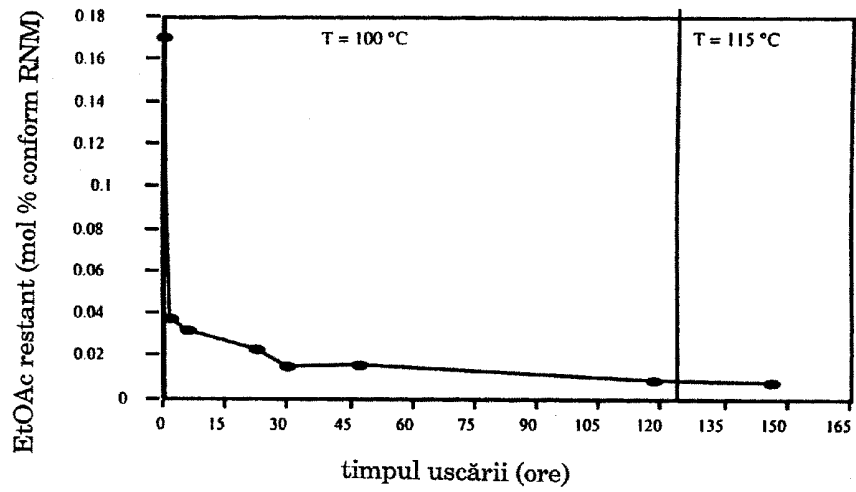


Fig. 5

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2000 0162		
(22) Data depozit: 2000.07.28		
Prioritatea invocată : (31) nr.: 60/146,286; 60/147,570; 60/149,773 32) data : 1999.07.29; 1999.08.06; 1999.08.19 33) țara :US (51) ⁷ : C 07 D 333/64; A 61 K 31/4535; A 61 P 5/32, 35/00 Alți indici de clasificare: Titlul : Hidrat cristalin de hidrociorură de 6-hidroxi-3-(4-[2-(piperidin-1-il)etoxi]fenoxi)-2-(4-metoxifenil)benzo[b]tiofen, procedeu de obinere, compoziție farmaceutică care îl conține și utilizarea lui pentru inhibarea stărilor patologice și activarea colinacetyltransferazei (71) Solicitantul : ELI LILLY AND COMPANY, US Termeni caracteristici : Hidrat cristalin de hidrociorură de 6-hidroxi-3-(4-[2-(piperidin-1-il)etoxi]fenoxi)-2-(4-metoxifenil)benzo[b]tiofen, arzofen		
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl. (7))		
Int. Cl. ⁷ C 07 D 333/64; A 61 K 31/4535; A 61 P 5/32, 35/00 MD Baza de date 1994-2002 EA Buletine Oficial 1995-2002 SU Colecția de certificate de autor 1970-1991		
II. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	US 5510357 1996.04.23	1, 2, 14
A	US 5723474 1998.03.03	1, 2, 14
A	EP 0729956 1996.09.04	1, 2, 14
<input type="checkbox"/> Documentele următoare sunt indicate in continuare a rubricii II		<input type="checkbox"/> Informația referitoare la brevete paralele se anexează
* categoriile speciale ale documentelor consultate:		P - document publicat înainte de data de depozit dar după data priorității invocate
A - document care definește stadiul anterior general		T - document publicat după data de depozit sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidența principiul sau teoria care conține baza invenției
E - document anterior dar publicat la data de depozit național reglementar sau după aceasta data		X - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă
L - document care poate pune în discuție data priorității invocate, poate contribui la determinarea datei publicării altor divulgări sau pentru un motiv expres (se va indica motivul)		Y - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă cand documentul este asociat cu unul sau mai multe alte documente de aceeași natură, aceasta combinație fiind evidentă pentru o persoană de specialitate
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere sau orice altă		& - document care face parte din aceeași familie de documente
Data finalizării documentării		2003.10.17
Examinatorul		EGOROVA Tamara